

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nierenkarzinom-spezifische T-Zellen"

am 24. Juni 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 14. Mai 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Aktenzeichen: 196 25 191.5

betriedt

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN
KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621
TELEFAX (089) 4 70 50 68

24. Juni 1996

Unser Zeichen:
13714P DE/WWjuvs

Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof

Boehringer



Nierenkarzinom-spezifische T-Zellen

Nierenkarzinom-spezifische T-Zellen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen des humanen T-Zellrezeptors und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Karzinomen, insbesondere Nierenzellkarzinomen.

10

Die T-Lymphozyten des Immunsystems sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Sie sind zur Erkennung und Beseitigung von erkrankten Körperzellen in der Lage, z.B. von Zellen, die fremde Proteine enthalten, oder von Tumorzellen. Die
15 Erkennung erkrankter Körperzellen erfolgt durch den sogenannten T-Zellrezeptor (TCR), der ein für die erkrankte Zelle spezifisches Antigen in Form von kurzen Peptidfragmenten bindet. Diese Peptidfragmente werden von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert.

20

T-Zellrezeptoren bestehen aus zwei verschiedenen Polypeptid-untereinheiten, üblicherweise den sogenannten T-Zellrezeptor α - oder β -Ketten, die miteinander durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die α - und β -Ketten sind wiederum aus variablen
25 und konstanten Regionen zusammengesetzt. Die variablen Regionen der α -Kette umfassen V- und J-Gensegmente und die variablen Regionen der β -Kette umfassen V-, D- und J-Gensegmente.

30 Das TCR- α -Kettengen besteht aus über 100 variablen Segmenten, von denen jedes ein Exon für eine V-Region enthält, dem ein anderes Exon voransteht, das für eine Leadersequenz kodiert, die einen Transport des Proteins an die Zelloberfläche ermöglicht. Eine Gruppe von 61 J-Segmenten liegt in beträchtlicher
35 Entfernung von den V-Segmenten. Den J-Segmenten folgt ein einzelnes C-Segment für den konstanten Bereich, das wiederum getrennte Exons für die konstante Region und die Hinge-Region

sowie ein Exon für die Transmembran- und Cytoplasmaregionen enthält.

Das TCR- β -Kettengen enthält eine Gruppe von ungefähr 30 V-
5 Gensegmenten, die in einiger Entfernung von 2 getrennten Clustern liegen, die jeweils ein einzelnes D-Segment und 6 bzw. 7 J-Segmente sowie ein einzelnes C-Segment enthalten. Jedes konstante Segment der β -Kette besitzt separate Exons für die konstante, die Hinge-, die Transmembran- und die Cytoplasmare-
10 gion.

Während der Entwicklung der T-Zelle werden die getrennten Segmente durch somatische Rekombination verknüpft. Für die α -Kette gelangt ein $V\alpha$ -Gensegment neben ein $J\alpha$ -Gensegment und
15 damit entsteht ein funktionelles Exon. Durch Transkription und Splicing des $VJ\alpha$ -Exon an die konstante Region wird die mRNA gebildet, die zur TCR- α -Kette translatiert wird. Die Umordnung der für die variable Domäne der β -Kette kodierenden Gensegmente $V\beta$, $D\beta$ und $J\beta$ schafft ein funktionelles Exon, das trans-
20 kribiert und durch Splicing an $C\beta$ angefügt wird. Die entstandene mRNA wird zur TCR- β -Kette translatiert. Die α - und β -Ketten verbinden sich nach ihrer Biosynthese zum $\alpha: \beta$ TCR-Heterodimer. Der für die Spezifität der Antigenerkennung verantwortliche hochvariable Bereich des TCR, der im Bereich der
25 Verknüpfung von V-, (D-) und J-Gensegmenten liegt, wird als CDR3-Region bezeichnet.

Aufgrund der hohen Variabilität von T-Zellrezeptoren ist die Identifizierung spezifischer Nucleotid- und Aminosäuresequen-
30 zen insbesondere im Bereich der CDR3-Antigenerkennungsregion nur mit sehr hohem Aufwand möglich. Es besteht daher ein großes Bedürfnis, Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen von T-Zellrezeptoren bereitzustellen, die spezifisch zur Erkennung von klinisch relevanten Peptidantigenen, insbesondere von
35 tumorspezifischen Peptidantigenen in der Lage sind.

Erfindungsgemäß konnten Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) aus einem Nierenkarzinom gewonnen werden, die eine hohe Spezifität für Tumorgewebe aus Patienten mit dem HLA-A*0201-Allel besitzen. Mit gesundem Nierengewebe aus dem gleichen Patienten
5 zeigen diese TIL keine Reaktion.

Es wurde eine Analyse der Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der von diesen TIL exprimierten T-Zellrezeptoren durchgeführt. Dabei wurde zunächst nach Kultivierung und periodischer Resti-
10 mulierung der TIL über eine Dauer von 62 bzw. 74 Tagen ein einheitlicher CD8⁺ T-Zellklon erhalten. Die für die α - bzw. β -Kette des T-Zellrezeptors kodierende cDNA wurde sequenziert. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der α -Kette sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 angegeben.
15 Die CDR3 α -Region in SEQ ID No. 1 reicht von bp 313 bis 348 entsprechend den Aminosäuren 87-98 in SEQ ID No. 2. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der β -Kette sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4 angegeben. Die CDR3 β -Region in SEQ ID No. 3 reicht von bp 331 bis 369 in SEQ
20 ID No. 3 entsprechend den Aminosäuren 90-102.

Bei der α -Kette wurde in der variablen Region eine Kombination von V α 20 mit J α 22 und bei der β -Kette eine Kombination von V β 22, D β 2 und J β 2.7 gefunden.

25 Anschließend wurde eine Sequenzanalyse der tumorspezifischen T-Zellrezeptoren bei einer nur 24-tägigen Kultivierung durchgeführt. Dabei wurde kein einheitlicher T-Zellklon, sondern ein Gemisch aus mehreren T-Zellspezies gefunden. Für die α -
30 Kette konnten die in SEQ ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz sowie insgesamt zwei weitere Aminosäuresequenzen identifiziert werden. 11 von 56 untersuchten T-Zellspezies kodierten dabei für die in SEQ ID No. 2 von Position 87 bis 98 angegebene Aminosäuresequenz der CDR3 α -Region. Die Nucleotidsequenz der
35 α -Ketten in diesen T-Zellen unterschied sich von der in SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz nur durch einen Austausch T gegen G an Position 324.

Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region einer weiteren α -Kette, die in 38 der 56 untersuchten T-Zellen identifiziert wurde, ist in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 5 und 6 angegeben. Darüber hinaus wurden zwei weitere T-Zellspezies identifiziert, die eine CDR3 α -Region mit derselben Aminosäuresequenz wie in SEQ ID No. 6 gezeigt enthalten, die sich aber jeweils durch einen Basenaustausch in der Nucleotidsequenz (C an Position 9 durch G bzw. T an Position 12 durch C) unterscheiden.

10

Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3 α -Region aus einer dritten T-Zellvariante, die in einer Häufigkeit von 5 von 56 untersuchten T-Zellspezies auftrat, ist in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 7 und 8 angegeben.

15

Die entsprechende Sequenzierung der β -Ketten ergab insgesamt 6 unterschiedliche Aminosäuresequenzen für die CDR3-Region. Eine CDR3 β -Sequenz, die bei 15 von 50 untersuchten T-Zellen gefunden wurde, ist in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 9 und 10 angegeben. Eine weitere T-Zellspezies enthielt die gleiche Aminosäuresequenz, aber eine unterschiedliche Nucleotidsequenz (Austausch von A an Position 15 durch T).

Jeweils eine T-Zellspezies enthielt die in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 11 und 12, 13 und 14 bzw. 15 und 16 angegebenen Nucleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in der CDR3 β -Region.

27 von 50 Klonen enthielten die in den Sequenzprotokollen 17 und 18 gezeigten Nucleotid- und Aminosäuresequenzen in der CDR3 β -Region. 4 von 50 untersuchten Klonen enthielten die in den Sequenzprotokollen SEQ ID. No. 19 und 20 angegebenen Nucleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in der CDR3 β -Region.

Weiterhin wurde eine in situ-Sequenzierung von TIL, d.h. eine Sequenzierung ohne vorherige Kultivierung, durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus dem Tumor isoliert, mit einem TCR α - bzw. TCR β -spezifischen Primer und reverser Transkriptase

eine TCR-spezifische cDNA hergestellt und diese cDNA unter Verwendung familienspezifischer Primer (V α 20 bzw. V β 22) selektiv durch PCR amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden in E.coli kloniert und sequenziert. Dabei wurde eine Reihe von
5 Einzelsequenzen erhalten.

Circa 60 % aller Sequenzen der α -Kette entsprechen den in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 2, 6 und 8 angegebenen Aminosäuresequenzen. Weitere 20 % hatten sehr ähnliche Sequenzen, die
10 ebenfalls aus einer Kombination von V α 20 und J α 22 bestehen. Eine Übersicht der bei dieser in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 26 identifizierten CDR3 α -Regionen ist in Abb. 1 gezeigt.

Weiterhin wurde bei der in situ-Sequenzierung gefunden, daß
15 ca. 70 % aller Sequenzen der β -Kette den in den Sequenzprotokollen 4, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 angegebenen Aminosäuresequenzen entsprechen. Eine Übersicht der bei der in situ-Sequenzierung identifizierten CDR3-Sequenzen der β -Kette ist in
20 Abb. 2 gezeigt.

In einem Kontrollexperiment wurden TIL aus einem anderen Patienten mit dem HLA-A*0201-Allel durch in situ-Sequenzierung analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß die CDR3- α -Regionen
25 von 15 bzw. 4 der insgesamt untersuchten 34 T-Zellspezies die in SEQ ID No. 2 bzw. SEQ ID No. 6 dargestellte Aminosäuresequenzen enthielten. Eine Übersicht der relevanten CDR3 α -Sequenzen und ihre Häufigkeit ist in Abb. 3 gezeigt. Eine Übersicht der Ergebnisse, die bei der Sequenzierung von CDR3-
30 Regionen der β -Kette erhalten wurden, ist in Abb. 4 dargestellt.

In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung somit eine Nucleinsäure, die für die α -Kette eines humanen T-
35 Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region, gebildet aus der Kombination eines V α 20-Gensegments mit einem J α 22-Gensegment umfaßt.

Die Länge des von dieser CDR3-Region kodierten Aminosäureabschnitts ist 11-14 Aminosäuren, vorzugsweise 12 oder 13 Aminosäuren. Besonders bevorzugt kodiert die CDR3-Region für eine der in den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 2, 6 und 8 angegebene Aminosäuresequenz, eine damit mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % identische Sequenz oder eine Sequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente des T-Zellrezeptorliganden kodiert.

10

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, die für die α -Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

15

- (a) einer für die Aminosäuresequenz

Y C L (X₁ ... X_n) S A R Q L T F (I)

20

kodierenden Nucleotidsequenz,
wobei X₁ ... X_n eine Sequenz von 3-5 Aminosäuren darstellt,

25

- (b) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % zur Aminosäuresequenz aus (a) kodiert, oder

30

- (c) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente des T-Zellrezeptor-Liganden kodiert.

Vorzugsweise ist die Aminosäuresequenz X₁ ... X_n ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Aminosäuresequenzen VGG, VLSG, 35 ATG, VSG, DSG, VVSG, ALAG, APSG und VGR. Besonders bevorzugt wird die Aminosäuresequenz X₁ ... X_n ausgewählt aus den Aminosäuresequenzen VGG, VLSG und ATG.

Auffällig ist bei den erfindungsgemäßen tumorspezifischen CDR3 α -Regionen insbesondere eine Länge von 12-13 Aminosäuren sowie ein gemeinsames Sequenzmotiv. So ist bei einer Länge der Sequenz $X_1 \dots X_n$ von 3 Aminosäuren vorzugsweise $X_1 = V$ oder A ,
5 $X_2 = T, G$ oder S und $X_3 = G$. Bei einer Länge der Sequenz $X_1 \dots X_n$ von 4 Aminosäuren ist vorzugsweise $X_1 = V$ oder A , mindestens einer von X_2 oder X_3, T oder S und $X_4 = G$.

Eine Sequenzierung der β -Ketten aus beiden untersuchten Pa-
10 tienten ergab eine Kombination der Gensegmente $V\beta 22, D\beta 1$ bzw. $D\beta 2$ und $J\beta 2.7$ für den ersten Patienten und eine Kombination der Gensegmente von $V\beta 22, D\beta 1$ bzw. $D\beta 2$ und $J\beta 2.1, J\beta 2.3$ bzw. $J\beta 2.7$ für den zweiten Patienten.

15 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nucleinsäure, die für die β -Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region gebildet aus der Kombination eines $V\beta 22$ - Gensegments eines $D\beta 1$ - oder $D\beta 2$ -Gensegments und eines
20 $J\beta$ -Gensegments, insbesondere eines $J\beta 2.1$ -, $J\beta 2.3$ oder $J\beta 2.7$ -Gensegments umfaßt.

Die Länge des von dieser CDR3 β -Region kodierten Aminosäureabschnitts ist 12-14 Aminosäuren, vorzugsweise 13 Aminosäuren.
25 Weiterhin enthält diese CDR3 β -Region bevorzugt ein gemeinsames Sequenzmotiv, nämlich $X-T$ oder $S-X-S$, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht und T oder S besonders bevorzugt T bedeutet. Insgesamt 70 % der untersuchten T-Zellrezeptoren weisen ein derartiges Sequenzmuster auf.

30 Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, die für die β -Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt ist:

35

(a) einer für die Aminosäuresequenz

$C A (X'_1 \dots X'_n) Y/D E Q Y F$

(II)

kodierenden Nucleotidsequenz,
wobei $X'_1 \dots X'_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren dar-
stellt,

- 5 (b) einer für die Aminosäuresequenz

$C A (X''_1 \dots X''_n) N E Q F F$ (III)

10 kodierenden Nucleotidsequenz,
wobei $X''_1 \dots X''_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren dar-
stellt,

- (c) einer für die Aminosäuresequenz

15 $C A (X'''_1 \dots X'''_n) D T Q Y F$ (IV)

kodierenden Nucleotidsequenz,
wobei $X'''_1 \dots X'''_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren
darstellt,

20

- (d) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz
mit einer Identität von mindestens 80 % und insbesondere
von mindestens 90 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a),
(b) oder/und (c) kodiert, oder

25

- (e) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz
mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Pep-
tidkomponente des T-Zellrezeptorliganden kodiert.

30 Die Aminosäuresequenz $X'_1 \dots X'_n$ ist vorzugsweise aus der
Gruppe ausgewählt, bestehend aus SSETNS, SSETSS, TSGTAS,
RSGTGS, SSGTDS, SSGTRS, SSGSDS, SSSTGS, SSSTVS, SSSTLS,
SSSTLF, SSSTAS, SSHTDS, SSDTLS UND SRWDSE. Besonders bevorzugt
stellt die Aminosäuresequenz $X'_1 \dots X'_n$ SSETNS, SSGTDS, TSGTAS
35 oder RSGTGS dar. Die Aminosäuresequenz $X''_1 \dots X''_n$ bedeutet
vorzugsweise SSGTSSY oder SSDQGM. Die Aminosäuresequenz X'''_1
 $\dots X'''_n$ bedeutet vorzugsweise SADSFK.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3 α -oder/und CDR3 β -Region wie vorstehend definiert umfaßt und
5 zusammen mit der jeweiligen komplementären Kette des humanen T-Zellrezeptors (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein T-Zellrezeptor-Derivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für einen von einem MHC-Molekül präsentierten Peptidliganden wie der nicht-derivatisierte T-Zellrezeptor
10 besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges T-Zellrezeptor-Derivat eine Bindungskonstante von mindestens 10^{-4} l/mol, vorzugsweise 10^{-4} bis 10^{-5} l/mol für den präsentierten Peptidliganden auf.

15 Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen T-Zellrezeptors kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen. Die Herstellung von rekombinanten T-Zell-
20 rezeptorketten ist beispielsweise bei Blank et al. (1993), Eur. J. Immunol. 23, 3057-3065; Lin et al. (1990) Science 249: 677, Gregoire et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8077; Kappes und Tonegawa (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10619 und Ward (1991), Scand. J. Immunol. 34: 215, be-
25 schrieben. Auf diese Literaturstellen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von T-Zellrezeptorketten oder T-Zellrezeptoren sind Einzelketten-T-Zellrezeptoren, die beispielsweise aus den variablen Domänen der α - und β -Kette und einer konstanten Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Chung et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12654-12658, beschrieben. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für funktionelle Derivate sind lösliche TCR-Fragmente, die als getrennte Polypeptide oder als Einzelketten-Polypeptide hergestellt werden können, vgl. z.B. Hilyard et al. (1994), Proc. Natl. Acad.
35

Sci. USA 91: 9057-9061. Auch auf die Offenbarung in diesen Literaturstellen wird ausdrücklich Bezug genommen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein
5 Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakterio-
phagen. Derartige Vektoren sind bei Sambrook et al., Molecular
10 Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1-4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist der prokaryontische Vektor ein Plasmid.

15 Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Pflanzenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (ein Plasmidvektor oder ein viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind bei Sambrook et al, Supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone,
20 Eine Einführung in die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft, insbesondere in den Kapiteln 5, 8 und 10, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
25 eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure exprimiert oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische
30 Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugierzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nucleinsäure in derartige Zellen finden sich in den obigen Literaturstellen.

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure kodiert ist. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die

variable Domäne der α - oder/und β -Kette eines humanen T-Zell-rezeptors.

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das T-Zellrezeptor-
5 Eigenschaften aufweist und aus einer TCR- α -Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie einer TCR- β -Kette oder einem funktionellen Derivat davon als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelketten-Polypeptid vorliegen. Außerdem kann
10 das Polypeptid auch in oligomerisierter Form vorliegen, wobei mindestens 2 und vorzugsweise 2-10 TCR α - und TCR β -Ketten miteinander verknüpft vorliegen. Die Verknüpfung kann z.B. mittels bifunktioneller chemischer Linker erfolgen.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen eine für die Erkennung des Peptidliganden verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper
20 oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, F(ab)₂-, Fab'- oder F(ab')₂-Fragment) sein. Vorzugsweise ist der Antikörper gegen eine CDR3-Region des Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Im-
25 munisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und Gewinnung der resultierenden Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Monoklonale Antikörper können durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit
30 einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder eine Weiterentwicklung davon erhalten werden. Spezifische Beispiele für die Herstellung solcher Antikörper finden sich bei Choi et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8357-8361 und Zumla et al. (1992), Hum. Immunol. 35: 141.

35

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die einen erfindungsgemäßen T-Zellrezeptor ent-

hält. Derartige T-Zellen können aus Patienten mit Nierenzellkarzinom isoliert und dann in vitro expandiert werden. Hierzu können beispielsweise die peripheren mononucleären Blutzellen eines Patienten durch Stimulation mit geeigneten Antigenen und anschließender Restimulation z.B. durch eine bestrahlte autologe Lymphoblastoid-Zelllinie, Tumorzellen, Lymphoblastoidzellen plus Antigen oder autologe periphere Blutlymphozyten plus Antigen, erzeugt werden. Weitere Verfahren zur Gewinnung erfindungsgemäßer T-Zellen sind weiter unten beschrieben.

10

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nucleinsäure, ein Polypeptid, einen an das Polypeptid bindefähigen Peptidliganden, gegebenenfalls in Assoziation mit einem entsprechenden MHC-Molekül, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor angegeben, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz-, oder Trägerstoffen enthält. Beispiele für weitere aktive Komponenten sind akzessorische stimulierende Komponenten, z.B. Cytokine, wie IL-2 und IL-4.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostische Anwendungen sind die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei einer Tumorerkrankung, z.B. nach einer Chemotherapie oder einem chirurgischen Eingriff.

30

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel umfaßt vorzugsweise den Nachweis einer T-Zellsubpopulation, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid als T-Zellrezeptor exprimiert. Der Nachweis dieses T-Zellrezeptors kann beispielsweise auf Nucleinsäureebene, z.B. durch einen Nucleinsäure-Hybridisierungsassay, gegebenenfalls mit vorschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nach-

weis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem T-Zellrezeptor reagierenden Antikörpern erfolgen. Außerdem ist der Nachweis der T-Zellen beispielsweise auch über einen Test auf Bindung an spezifische Peptidliganden oder in einem Aktivitätstest, bei dem die spezifische cytotoxische Wirkung der T-Zellen oder die Freisetzung von Cytokinen wie TNF oder IFN γ bestimmt wird, möglich.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie einer Tumorerkrankung, z.B. eines Nierenzellkarzinoms. Diese therapeutische Anwendung kann beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulation des Wachstums von T-Zellen, die den tumorspezifischen T-Zellenrezeptor exprimieren, in vitro oder in vivo erfolgt. Die Wachstumsstimulierung in vivo kann beispielsweise durch Verabreichung des Peptidliganden des T-Zellrezeptors oder/und des gesamten Moleküls, aus dem der Peptidligand stammt, oder eines Fragments davon erfolgen. Weiterhin kann die Wachstumsstimulierung in vivo auch durch Verabreichung eines spezifischen T-Zellrezeptor durch Bindung aktivierenden Antikörpers, z.B. eines monoklonalen Antikörpers oder eines monoklonalen Antikörperfragments bewirkt werden.

Andererseits kann die Wachstumsstimulierung der T-Zellen auch in vitro durchgeführt werden, beispielsweise durch Gewinnung spezifischer T-Zellen aus dem Patienten, in vitro-Expansion und anschließende Verabreichung der expandierten T-Zellen als Tumorstoffimpfung. Die Gewinnung von T-Zellen aus einem Patienten, die einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor exprimieren, erfolgt vorzugsweise derart, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe aus dem Patienten, z.B. eine Blutprobe und vorzugsweise eine aus dem Tumorgewebe stammende Probe mit einem spezifisch an die CDR3-Region des T-Zellrezeptors bindenden Mittel in Kontakt bringt, die mit dem Mittel reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt. Das an die CDR3-Region des T-Zellrezeptors bindende Mittel

wird vorzugsweise ausgewählt aus dem Peptidliganden der T-Zellen, einem Peptidligand-MHC-Komplex oder/und einem Anti-TCR-Antikörper. Gegebenenfalls kann die in vitro-Expansion zusätzlich in Gegenwart costimulatorischer Faktoren durchgeführt werden, z.B. Anti-CD28-Antikörpern. Vorzugsweise wird zur Erleichterung der Abtrennung der gewünschten T-Zellsubpopulation das Mittel in einer immobilisierten oder immobilisierbaren Form verwendet.

10 Die Gewinnung von T-Zellen, die einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor exprimiert, kann jedoch auch auf andere Weise erfolgen, z.B. durch Einführen von Nucleinsäuresequenzen, die für den T-Zellrezeptor kodieren, in eine T-Zelllinie, vorzugsweise eine cytotoxische T-Zelllinie. In dieser transfizierten
15 T-Zelllinie erfolgt dann eine Expression des T-Zellrezeptors. Auf diese Weise sind T-Zellen, welche einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor exprimieren, in größeren Mengen erhältlich.

Noch eine andere Möglichkeit zur Gewinnung von T-Zellen, die
20 einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor exprimieren, besteht darin, daß man Nucleinsäuresequenzen, die für den T-Zellrezeptor kodieren, in die Keimbahn eines Tieres einführt und die T-Zellen aus dem resultierenden transgenen Tier oder Nachkommen davon gewinnt. Vorzugsweise werden transgene Mäuse hergestellt.
25 Weiterhin ist bevorzugt, daß die transgenen Mäuse neben dem T-Zellrezeptor auch das humane CD8-Molekül oder/und das humane HLA-A*0201-Molekül exprimieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit
30 auch ein transgenes Tier, welche T-Zellen besitzt, die einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor exprimieren. Vorzugsweise ist dieses transgene Tier ein Nagetier, insbesondere eine Maus.

Schließlich betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur
35 Identifizierung von Peptidliganden eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors. Dieses Verfahren umfaßt vorzugsweise die Schritte:

- (a) Gewinnen von RNA aus Tumorgewebe,
- (b) Überführen der RNA in doppelsträngige cDNA-Moleküle,
- 5 (c) Einbringen der cDNA-Moleküle in Wirtszellen, wobei eine cDNA-Bank erhalten wird,
- (d) Transfizieren von eukaryontischen Empfängerzellen mit Aliquots der cDNA-Bank, wobei (i) eine Cotransfektion mit
10 HLA-A*0201-DNA erfolgt oder (ii) HLA-A*0201 positive Empfängerzellen verwendet werden,
- (e) Testen der transfizierten Empfängerzellen auf Fähigkeit zur Sekretion von Cytokinen wie etwa TNF, wobei z.B. die
15 Lyse von TNF-sensitiven Zellen untersucht werden kann,
- (f) Identifizieren einer cDNA-Sequenz, die für das Antigen, welches den Peptidliganden enthält, kodiert und
- 20 (g) Identifizieren der Sequenz des Peptidliganden.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele, Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen

- 25 SEQ ID No. 1: Die Nucleotidsequenz der TCR- α -Kette eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors, wobei bp 55-324/325 für das TCR-V α 20-Gensegment kodieren, bp 325/326 für das TCR J α 22-Gensegment kodieren, bp 381-804 für das TCR-C α -Gensegment kodieren und bp 805-1341 einen 3'-untranslatierten Bereich darstellen,
30
- SEQ ID No. 2: Die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID. No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz,
- SEQ ID No. 3: Die Nucleotidsequenz der TCR- β -Kette eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors, wobei bp 1-63
35 für das Leaderpeptid kodieren, bp 64-341 für das TCR-V β 22-Gensegment kodieren, bp 342-345 N-

- Nucleotide sind, bp 346-349 für das TCR-D β 2 Gensegment kodieren, bp 350 ein N-Nucleotid ist, bp 351-398 für das TCR-J β 2.7-Gensegment kodieren und bp 399-936 für das TCR-C β -Gensegment kodieren,
- 5 SEQ ID No. 4: Die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nucleotidsequenz,
- SEQ ID No. 5
10 und 6: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 α -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- SEQ ID No. 7
und 8: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 α -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- 15 SEQ ID No. 9
und 10: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- SEQ ID No. 11
und 12: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -
20 Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- SEQ ID No. 13
und 14: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- 25 SEQ ID No. 15
und 16: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- SEQ ID No. 17
30 und 18: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- SEQ ID No. 19
und 20: Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der CDR3 β -Region eines erfindungsgemäßen T-Zellrezeptors,
- 35 SEQ ID No. 21 die Nucleotidsequenz des TCR α -spezifischen Primers P-C α ST,
- SEQ ID No. 22 die Nucleotidsequenz des TCR β -spezifischen Primers P-C β ST,
- 40 Abb. 1 Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von CDR3 α -Regionen aus tumorspezifischen TCR, die durch

in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 26 bestimmt wurden,

Abb. 2 Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von CDR3 β -Regionen aus tumorspezifischen TCR, die durch in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 26 bestimmt wurden,

Abb. 3 Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von CDR3 α -Regionen aus tumorspezifischen TCR, die durch in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 22 bestimmt wurden und

Abb. 4 Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von CDR3 β -Regionen aus tumorspezifischen TCR, die durch in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 22 bestimmt wurden.

Beispiel 1

Analyse von T-Zellrezeptoren in HLA-A2-Patienten mit Nierenzellkarzinom

Im Nierenzellpatienten 26 wurden cytotoxische CD8⁺-T-Zellen identifiziert, die autologe Tumorzellen in einem HLA-A2-restringierten Mechanismus lysieren. Die T-Zellen besitzen eine hohe Tumorspezifität, da Kurzzeitkulturen von normalen Nierenzellen nicht erkannt werden. Die von den TIL des Patienten 26 erkannte Determinante wurde auch auf anderen Tumoren von Patienten gefunden, welche das HLA-A2-Gen, insbesondere das weit verbreitete HLA-A*0201-Allel, tragen. Normale Nierenzellen dieser Patienten wurden nicht lysiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Nierenkarzinomzellen des Patienten 26 eine Tumordeterminante exprimieren, d.h. einen Tumor-assoziierten Peptid/HLA-A2-Komplex, der auch auf Tumoren anderer Patienten vorliegt.

Zur Identifizierung und Sequenzierung von tumorspezifischen TCR wird aus T-Zellen Gesamt-RNA isoliert. Hierzu werden die Zellen in Suspension mit PBS gewaschen und das Zellpellet mit

0,2 ml RNazol-B pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Für die RNA-Extraktion aus Gewebe werden 2 ml RNazol-B pro 100 mg Gewebe eingesetzt. Nach mehrfachem mechanischen Resuspendieren der Lysate und gegebenenfalls Zugabe von Hefe tRNA als Trägermatrix erfolgt die RNA-Extraktion durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 2 ml Homogenisat, nachfolgendem Mischen für 15 sek. und 5-minütiger Lagerung auf Eis.

Nach einem Zentrifugationsschritt von 12000 g für 15 min. bei 4 °C wird die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die erste Präzipitation der RNA erfolgt durch Zugabe eines identischen Volumens Isopropanol und anschließender Lagerung für mindestens 15 min. bei 4 °C. Nach Zentrifugation für 15 min. bei 12000 g und 4 °C wird die RNA als weißes Pellet am Grund des Gefäßes erhalten.

Nach Verwerfen des Überstandes wird das RNA-Pellet durch kurzes Mischen in 75 % Ethanol von Salzen gereinigt. Nach Zentrifugation (7500 g, 4 °C, 8 min.) wird das Pellet in 175 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst und mit 500 µl Ethanol und 75 µl 2 M NaCl für mindestens 1 h bei - 20 °C erneut präzipitiert. Die Zentrifugations- und Waschschritte nach der zweiten Präzipitation erfolgen wie bei der ersten Fällung beschrieben. Nach Lufttrocknung des Pellets wird die RNA in H₂O-DEPC oder 0,5 % SDS, pH 6,5 bis 7,0 oder 1 mM EDTA, pH 7,0 resuspendiert.

Anschließend wird aus der RNA durch reverse Transkription cDNA synthetisiert. Hierzu werden 3 µg Gesamt-RNA mit 30 ng P-CαST (ein für die TCR-α-Kette spezifischer Primer mit der in SEQ ID No. 21 gezeigten Sequenz 5'-CAC TGA AGA TCC ATC ATC TG-3') und 30 ng P-CβST (ein für die TCR-β-Kette spezifischer Primer mit der in SEQ ID No. 22 gezeigten Sequenz 5'-TAG AGG ATG GTG GCA GAC AG-3') in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 10 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend werden 38 µl RAV-2-RT-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 140 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM Dithiothreitol, jeweils 0,1 mM dNTP), 1 µl (0,75 U) rRNasin und

1 μ l (18 U) reverse Transkriptase zupipettiert. Die reverse Transkription erfolgt für 1 h bei 42 °C, gefolgt von einem Denaturierungsschritt bei 68 °C für 5 min. Die Lagerung bis zum Verbrauch erfolgt bei - 20 °C.

5

Anschließend wird eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die Primer können biotinyliert sein, um eine nachfolgende Aufreinigung der PCR-Produkte durch Kopplung an eine magnetische partikuläre Festphase (Streptavidin-beschichtete

10 Beads) zu ermöglichen.

Die PCR wird unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase mit folgendem Reaktionsschema durchgeführt:

15 95 °C 5 min. Prädenaturierung (nur am Anfang)

95 °C 30 sek. DNA-Denaturierung

56 °C 1 min. Annealing

72 °C 1 min. Extension

72 °C 10 min. Auffüllen aller Einzelstränge in der Reaktions-
20 lösung (nur am Ende).

Die Anzahl von Reaktionszyklen bei der PCR ist in der Regel 30.

25 Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Fragmente werden sequenziert.

Bei Kultivierung und periodischer Restimulierung der cytotoxischen T-Zellen aus dem Patienten 26 über eine Dauer von 62
30 bzw. 74 Tagen wird ein einheitlicher CD8⁺ T-Zellklon erhalten. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der TCR- α -Kette dieses T-Zellklons aus dem Patienten 26 sind in SEQ ID No. 1 und 2 angegeben. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der TCR- β -Kette sind in SEQ ID No. 3 und 4 angegeben.

35

Bei einer nur 24-tägigen Kultivierung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus dem Patienten 26 wurde kein einheitlicher T-

Zellklon, sondern ein Gemisch aus mehreren T-Zellspezies gefunden. Die CDR α -Regionen dieser T-Zellspezies enthielten neben der in SEQ ID No. 2 gezeigten Aminosäuresequenz insgesamt 2 weitere Sequenzen (SEQ ID No. 5 und 6 bzw. 7 und 8) Die
5 CDR3 β -Regionen enthielten neben der in SEQ ID No. 4 gezeigten Aminosäuresequenz weitere nah verwandte Sequenzen (SEQ ID No. 9 und 10, 11 und 12, 13 und 14, 15 und 16, 17 und 18 bzw. 19 und 20).

10 Weiterhin wurde eine in situ-Sequenzierung von T-Zellen des Patienten 26, d.h. eine Sequenzierung ohne vorherige Kultivierung durchgeführt. Dabei wurde für die CDR3 α -Region eine Reihe von Einzelsequenzen erhalten, die in Abb. 1 angegeben ist. Circa 60 % aller Sequenzen der α -Kette entsprechen den bereits
15 zuvor angegebenen Sequenzen. Weitere 20 % entsprechen sehr ähnlichen Sequenzen.

Auch für die CDR3-Regionen der β -Kette wurde festgestellt, daß insgesamt 70 % der untersuchten T-Zellen des Patienten 26 ein
20 sehr ähnliches Sequenzmuster aufwiesen (Abb. 2).

Eine Analyse von peripheren Blutproben aus dem Patienten 26 auf T-Zellrezeptoren, welche die Merkmale der tumorspezifischen T-Zellrezeptoren aufweisen, wurde über insgesamt 4 Jahre
25 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß solche Sequenzen mit einer Häufigkeit von nur etwa 1/150 000 T-Zellen vorkommen.

Durch Cytotoxizitätsuntersuchungen wurde festgestellt, daß die
30 aus dem Patienten 26 gewonnenen tumorspezifischen T-Zellen auch Tumorzellen des ebenfalls das HLA-A*0201-Allel tragenden Patienten 22 lysieren konnten. Tumordinfiltrierende T-Zellen aus dem Patienten 22 konnten wiederum Tumorzellen aus dem Patienten 26 lysieren. Eine Sequenzierung der T-Zellrezeptoren
35 aus dem Patienten 22 ergab die für die CDR3 α -Region die in Abb. 3 und für die CDR3 β -Region die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse.

Beispiel 2

Expression von T-Zellrezeptoren

s 2.1 Expression tumorspezifischer T-Zellrezeptoren in humanen oder murinen T-Zelllinien

Die in Beispiel 1 identifizierten Nucleinsäuresequenzen, die für tumorspezifische TCR- α - und β -Ketten kodieren, werden in eukaryontische humane und murine Expressionsvektoren kloniert. Der humane Expressionsvektor ist bei Chung et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995): 3712-3716) beschrieben. Die murinen Vektoren sind bei Gabert et al. (Cell 50 (1987: 545-554) und Gregoire et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991): 8077-8081) beschrieben.

Die Klonierung der TCR-DNA kann entweder aus rearrangierter genomischer oder aus cDNA durchgeführt werden. Prinzipiell stehen zwei Klonierungsstrategien zur Verfügung: Erstens die Isolation von sehr langen TCR- α - und β -DNA-Fragmenten aus dem Genom reifer T-Zellen, die mehrere Kb-lange 5'-flankierende Sequenzen mit allen zur Expression benötigten regulatorischen Elementen enthalten. Alternativ können Vektoren gewählt werden, die bereits die natürlichen 5'-regulatorischen Elemente enthalten, und in die nur kurze, für die variablen Regionen kodierende Fragmente einkloniert werden müssen (Kouskoff et al. J. Immunol. Methods 180 (1995): 273-280). Bei der letztgenannten Methode wird die Sequenz der variablen Region (einschließlich der Leadersequenz) nach Amplifikation mittels spezifischer PCR durch Sequenzierung auf Fehler hin untersucht und anschließend nach Verdauung mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen in den Vektor eingebracht.

Die PCR- α - und β -Ketten können entweder in einen gemeinsamen oder in zwei verschiedene Vektoren kloniert werden. Jeder der verwendeten Vektoren enthält einen Selektionsmarker, der nach Transfektion der Empfängerzellen mit dem rekombinanten Plasmid die positive Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen erlaubt. Bevorzugte Selektionsmarker sind z.B. das Gen für die Neomycin-Resistenz (Neo) oder das Gen für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (GPT).

2.2 Expression funktioneller T-Zellrezeptoren als Einzelkettenkonstrukte

Analog zu Antikörpern können TCR als Einzelkettenkonstrukte in eukaryontischen Zellen zur Expression gebracht werden (Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 12654-12658). Hierbei wird ein Konstrukt hergestellt, das neben den variablen Domänen der TCR- α - und β -Kette ebenfalls die konstante Domäne der β -Kette enthält. Die einzelnen Domänen werden wie in Beispiel 1 beschrieben nach Isolation der entsprechenden RNA und reverser Transkription mittels PCR amplifiziert. Dabei werden an den Enden der Amplifikationsprodukte geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die einzelnen Fragmente werden dann in einen eukaryontischen Expressionsvektor (z.B. pBJ-Neo), der einen positiven Selektionsmarker trägt, wie folgt aneinandergefügt: Die variablen TCR- α - und β -Domänen, bestehend aus Leader-, V-(D-) und J-Exon werden durch eine Linkersequenz, z.B. ein für die Aminosäuresequenz (GGGGS)₃ kodierendes DNA-Fragment, getrennt. Das Exon für die konstante TCR- β -Domäne wird direkt an die variable β -Domäne ligiert.

An das 3'-Ende dieses Konstrukts können alternativ kodierende Sequenzen für einen GPI-Anker (Lin et al., Science 249 (1990): 677-679) oder z.B. den Transmembranteil und die Intrazellulärdomäne der CD3 ζ -Kette (Engel et al.,

Science 256 (1992): 1318-1321) ligiert werden. Nach Transfektion dieser Konstrukte in eukaryontische Zellen ermöglicht ersteres die Herstellung löslicher TCR-Moleküle, die als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden können. Letzteres erlaubt die funktionelle Analyse des Konstrukts in biologischen Systemen.

2.3 Herstellung von löslichen humanen TCR-Fragmenten in E.coli

Größere Mengen löslicher TCR-Fragmente können in E.coli als Einzelketten-Polypeptide hergestellt werden (Hilyard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 9057-9061).

Dazu werden verschiedene Gene bzw. Genfragmente in einen induzierbaren prokaryontischen Vektor, z.B. pUC19 kloniert. Die zu ligierenden Fragmente werden mittels spezifischer PCR reamplifiziert, wobei geeignete Restriktions-schnittstellen angefügt werden.

Folgende Fragmente werden in der aufgeführten Reihenfolge in den Vektor kloniert:

1. eine prokaryontische Signalsequenz, z.B. die pelB-Leadersequenz aus dem Pektat-Lyasegen von *Erwinia carotovora* (Ward et al., Nature 341 (1989): 8646-8650), die eine Sekretion des Polypeptids in das Periplasma des Wirtsbakteriums bewirkt.
2. Die variablen PCR- α - und β -Kettenfragmente aus einem tumorspezifischen TCR. Diese Fragmente werden vorzugsweise durch einen Linker, z.B. den in Beispiel 2.2 angegebenen Linker getrennt, wodurch eine bessere Löslichkeit und höhere Flexibilität des synthetisierten Moleküls erreicht wird.

3. Eine für einen Schwanz aus mehreren, z.B. 6
Histidinresten kodierende Nucleotidsequenz, wodurch
die Isolierung des rekombinanten Polypeptids durch
Affinitäts-Chromatographie, z.B. durch Nickel-Che-
lat-Chromatographie ermöglicht wird.

Beispiel 3

Herstellung von Antikörpern gegen tumorspezifische T-Zellre-
zeptoren

Zur Herstellung von Antiseren bzw. monoklonalen Antikörpern
gegen tumorspezifische TCR werden Mäuse mit dem entsprechenden
Antigen immunisiert. Die Immunisierung erfolgt nach den bei
Harlow, E. und David, C., Antibodies. A Laboratory Manual,
Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, angegebenen Protokollen.
Als Antigene können beispielsweise TCR-exprimierende Zellen
(Beispiel 2.1) oder lösliche TCR (Beispiel 2.2 oder Beispiel
2.3) gewählt werden.

Alternativ können die zur Immunisierung verwendeten löslichen
TCR auch als chimäre Proteine hergestellt werden, die aus
einer variablen TCR-Region, einer verkürzten konstanten TCR-
Region und aus einer konstanten Immunglobulinregion bestehen
(vgl. z.B. Gregoire et al. (1991), Supra). Dazu werden die
spezifischen variablen TCR- α - und β -Regionen in jeweils ein
Plasmid kloniert, das bereits das erste Exon die entsprechen-
den C-Region und eine IgGk-Domäne enthält. Beide Plasmide
enthalten zusätzlich einen positiven Selektionsmarker und die
zur korrekten Expression benötigten regulatorischen Elemente.
Beide Plasmide werden dann zur Transfektion einer Mausmyelom-
zelllinie verwendet, die keine endogenen schweren und leichten
Ig-Ketten exprimiert. Nach erfolgreicher Transfektion werden
beiden chimären Ketten synthetisiert und präferentiell als
Heterodimer sezerniert.

Alternativ kann ein TCR-Protein-Antigen zur Immunisierung von Mäusen auch wie folgt konstruiert werden: An ein TCR-Gensegment, bestehend aus (D-), J- und C-Gensegmenten aus einem Maus-T-Zellhybridom wird ein humanes V-Gensegment fusioniert, d.h. die Gensegmente werden in dieser Reihenfolge in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert (Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991): 8357-8361). Die humane Sequenz wird durch Amplifikation der V-Region aus der entsprechenden cDNA mittels PCR gewonnen. Solche Konstrukte werden dann zur Transfektion von Maus-T-Zellhybridomen verwendet, die alle Bestandteile außer den entsprechend transfizierten Ketten zur Verfügung stellen. Da die Plasmide ebenfalls für Selektionsmarker kodieren, können Transfektanten durch das entsprechende Medium positiv selektioniert werden. Da diese Transfektanten Maus T-Zellen darstellen, die eine humane V-Region exprimieren, erfolgt bei Immunisierung von Mäusen mit solchen Zellen nur eine Antikörperbildung gegen diese "fremde" humane Sequenz.

20 Beispiel 4

Identifizierung der Peptidliganden von tumorspezifischen T-Zellen

25 Poly-A⁺-mRNA wird aus einer Nierenzellkarzinomlinie unter Verwendung eines kommerziellen Kit (Fastrack/Invitrogen) isoliert und unter Verwendung des Superscript Choice System Kit (Gibco) unter Verwendung eines NotI/Oligo-dT-Primer für die Erststrangsynthese in Doppelstrang-cDNA überführt. Die cDNA wird mit BstXI-Adaptoren ligiert und mit NotI gespalten. Hochmolekulare, größenfraktionierte cDNA wird selektioniert und in den mit BstXI und NotI gespaltenen Vektor pcDNAI/Amp (Invitrogen) kloniert.

35 E.coli DH5- α -Zellen werden mit den rekombinanten Plasmiden durch Elektroporation transformiert und mit Ampicillin selektioniert. Die auf diese Weise erhaltene c-DNA-Bank wird in

1500 Pools aus jeweils ungefähr 100 Klonen unterteilt. Jeder Pool wird bis zur Sättigung amplifiziert und die Plasmid-DNA daraus durch alkalische Lyse ohne Phenolextraktion gewonnen.

5 Ungefähr jeweils 100 ng Plasmid-DNA eines Pools werden zusammen mit 50 ng Plasmid-DNA des gleichen Vektors, welcher die HLA-A*0201-cDNA (Genbank, ACC-Nr.: M32322, K02883, M84379, X02457) trägt, in 15000 COS7-Zellen nach der DEAE-Dextran-Chloroquin-Methode transfiziert. Alternativ können die COS7-
10 Zellen auch mit der HLA-A*0201-DNA transfiziert und die auf diese Weise erhaltenen stabilen Transfektanten als Empfängerzellen verwendet werden.

24-48 Stunden nach der Transfektion werden die COS7-Zellen auf
15 ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Freisetzung von TNF durch tumorspezifische cytotoxische T-Zellen (CTL) getestet. Ein Test wird jeweils mit 200 Pools, d.h. 200 unabhängigen Transfektionen von COS7-Zellen durchgeführt.

20 Hierzu werden 3000 CTL in die COS7-Transfektanten enthaltenden Vertiefungen von Mikrotiterplatten gegeben. Nach 18 Stunden wird der Überstand des Mediums gesammelt und dessen TNF-Gehalt unter Verwendung eines Aktivitätstests bestimmt, bei dem TNF-sensitive Zelllinien, wie etwa die Maus-Fibroblasten-Zelllinien
25 WEHI 164 oder L929 durch TNF lysiert werden. Lebensfähige Kulturen können von lysierten Zellen durch einen colorimetrischen Test unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) unterschieden werden.

30 Für jede positive Mikrokultur wird eine neue Runde der COS7-Transfektion durchgeführt, wobei jeweils kleinere Pools von Bakterien aus dem Ursprungspool mit insgesamt 100 Klonen verwendet wurden. Diese Prozedur wird wiederholt, bis ein einziges Plasmid identifiziert wird, welches die TNF-Freisetzung
35 aus den spezifischen TCL nach Coexpression mit der HLA-A*0201-cDNA in COS7-Zellen induzieren kann.

Die Sequenz der Plasmidinsertion wird durch Standardmethoden bestimmt. Die Bestätigung, daß diese Sequenz für das Tumorpeptid kodiert, erfolgt durch Transfektion normaler humaner HLA-A*0201-Zellen, die nicht durch die tumorspezifischen CTL ly-
5 siert werden. Diese Zellen werden nach Transfektion mit der entsprechenden cDNA für eine Lyse sensitiv. Weiterhin wird die tumorspezifische Expression der identifizierten cDNA durch Northern Blot unter Verwendung der cDNA als Sonde bestimmt. Diese Sonde wird zur Hybridisierung an mRNA aus verschiedenen
10 Tumor-Zelllinien normalen Gewebeproben verwendet.

Das tumorspezifische Peptid kann durch unterschiedliche Methoden identifiziert werden. Die korrespondierende Proteinsequenz wird aus der cDNA-Sequenz abgeleitet und nach Bindemotiven
15 durchmustert, die in anderen an HLA-A*0201 bindenden Peptiden identifiziert worden sind. Synthetische Peptide, die mit potentiellen HLA-A*0201-Binderegionen überlappen, werden dann auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung von CTL nach Inkubation mit HLA-A*0201-Zellen getestet. Alternativ können überlappende
20 Peptide von 8-9 Aminosäuren Länge durch Synthese erzeugt und auf ähnliche Weise getestet werden.

Beispiel 5

25 Herstellung transgener Mäuse

Gesamt-RNA wird aus einem spezifischen T-Zellklon isoliert, und cDNA wird durch reverse Transkription synthetisiert (vgl. Beispiel 1). Unter Verwendung von für die V-Region spezifischen Primern wird TCR-cDNA für die V α - und V β -Regionen am-
30 plifiziert und in TCR-Genkassetten kloniert, die konstante Regionen und die für die Expression notwendigen Regulations-
elemente enthalten. Es sind separate Kassetten für TCR- α - und TCR- β -Sequenzen bekannt, die jeweils einen verschiedenen Se-
35 lektionsmarker tragen (Kouskoff et al. (1995), Supra).

Fertilisierte Mausooocyten werden gleichzeitig mit DNA sowohl aus den TCR- α - als auch TCR- β -Kassetten mikroinjiziert. Die injizierten Oocyten werden in weibliche Mäuse rückübertragen (Mellor, A.L., Transgenesis and the T cell receptor. in: T cell receptors (1995), J. I. Bell, M. J. Owen, und E. Simpson, eds, pp194-223, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo).

Die Einführung produktiv umgelagerter TCR-Gene in die Maus hat einen großen Einfluß auf das TCR-Repertoire, da umgelagerte TCR-Fremdgene die weitere Umlagerung von endogenen TCR-Genen verhindern. Folglich exprimieren nahezu alle Thymocyten und T-Zellen den heterologen TCR-Klonotyp, so daß das TCR-Repertoire in solchen Mäusen im wesentlichen monoklonal ist.

15

Transgene Mäuse werden durch Genotypanalyse unter Verwendung von Sonden identifiziert, die spezifisch für die im Fremdgen enthaltene DNA sind, welche im Mausgenom nicht vorkommt. Dies kann entweder durch Southern Blot-Hybridisierung oder vorzugsweise durch PCR erfolgen.

20

Transgene Nachkommen der Mäuse werden durch Kreuzung mit nicht-transgenen Mäusen eines geeigneten Stammes, Typisierung der Nachkommenschaft und Verwendung zur Weiterkreuzung erhalten.

25

Patentansprüche

1. Nucleinsäure, die für die α -Kette eines humanen T-Zell-
rezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment
davon kodiert und eine CDR3-Region gebildet aus der Kom-
bination eines V α 20-und eines J α 22-Gensegments umfaßt.

2. Nucleinsäure, die für die α -Kette eines humanen T-Zell-
rezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment
davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt
aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz

Y C L (X₁ ... X_n) S A R Q L T F (I)

kodierenden Nucleotidsequenz,
wobei X₁ ... X_n eine Sequenz von 3-5 Aminosäuren
darstellt,

(b) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäurese-
quenz mit einer Identität von mindestens 80 % zur
Aminosäuresequenz aus (a) kodiert, oder

(c) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäurese-
quenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität
für die Peptidkomponente der T-Zellrezeptor-Liganden
kodiert.

3. Nucleinsäure nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Aminosäuresequenz X₁ ... X_n ausgewählt ist aus der
Gruppe, bestehend aus den Aminosäuresequenzen VGG, VLSG,
ATG, VSG, DSG, VVSG, ALAG, APSG und VGR.

4. Nucleinsäure nach Anspruch 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Aminosäuresequenz $X_1 \dots X_n$ ausgewählt ist aus der
Gruppe, bestehend aus den Aminosäuresequenzen VGG, VLSG
5 und ATG.
5. Vektor,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach
10 einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
6. Zelle,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis
15 4 exprimiert.
7. Zelle,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie mit einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1
20 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 5 transformiert
ist.
8. Polypeptid,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
25 daß es von einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1
bis 4 kodiert ist.
9. Polypeptid nach Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
30 daß es die variable Domäne der α -Kette eines humanen T-
Zellrezeptors umfaßt.
10. Nucleinsäure, die für die β -Kette eines humanen T-Zellre-
zeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment
35 davon kodiert und eine CDR3-Region gebildet aus der Kom-
bination eines V β 22-Gensegments, eines D β 1- oder D β 2-

Gensegments und eines $J\beta$ -Gensegments, insbesondere eines $J\beta 2.1$ -, $J\beta 2.3$ oder $J\beta 2.7$ -Gensegments umfaßt.

11. Nucleinsäure, die für die β -Kette eines humanen T-Zell-rezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt ist:

(a) einer für die Aminosäuresequenz

10

C A ($X'_1 \dots X'_n$) Y/D E Q Y F (II)

kodierenden Nucleotidsequenz,

wobei $X'_1 \dots X'_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren darstellt,

15

(b) einer für die Aminosäuresequenz

20

C A ($X''_1 \dots X''_n$) N E Q F F (III)

kodierenden Nucleotidsequenz,

wobei $X''_1 \dots X''_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren darstellt,

25

(c) einer für die Aminosäuresequenz

C A ($X'''_1 \dots X'''_n$) D T Q Y F (IV)

kodierenden Nucleotidsequenz,

wobei $X'''_1 \dots X'''_n$ eine Sequenz von 5-7 Aminosäuren darstellt,

30

(d) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b) oder/und (c) kodiert, oder

35

- (e) einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente des T-Zellrezeptor-Liganden kodiert.

5

12. Nucleinsäure nach Anspruch 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Aminosäuresequenz $X'_1 \dots X'_n$ ausgewählt ist aus
der Gruppe, bestehend aus SSETNS, SSETSS, TSGTAS, RSGTGS,
10 SSGTDS, SSGTRS, SSGSDS, SSSTGS, SSSTVS, SSSTLS, SSSTLF,
SSSTAS, SSHTDS, SSDTLS und SRWDSE.

15

13. Nucleinsäure nach Anspruch 12,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Aminosäuresequenz $X'_1 \dots X'_n$ SSETNS, SSGTDS,
TSGTAS oder RSGTGS darstellt.

20

14. Nucleinsäure nach Anspruch 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Aminosäuresequenz $X''_1 \dots X''_n$ SSGTSSY oder
SSDQGM darstellt oder daß die Aminosäuresequenz $X'''_1 \dots$
 X'''_n SADSFK darstellt.

25

15. Vektor,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach
einem der Ansprüche 10 bis 14 enthält.

30

16. Zelle,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 10 bis
14 exprimiert.

35

17. Zelle,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß sie mit einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 10 bis 14 oder einem Vektor nach Anspruch 15 transformiert ist.

5 18. Polypeptid,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß es von einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 10 bis 14 kodiert ist.

10 19. Polypeptid nach Anspruch 18,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß es die variable Domäne der β -Kette eines humanen T-Zellrezeptors umfaßt.

15 20. Polypeptid,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß es T-Zellrezeptor-Eigenschaften aufweist und aus einem Polypeptid nach Anspruch 8 oder 9 sowie einem Polypeptid nach Anspruch 18 oder 19 als Untereinheiten aufgebaut ist.
20

21. Polypeptid nach einem der Ansprüche 8, 9, 18, 19 oder 20,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.
25

22. Polypeptid nach einem der Ansprüche 8, 9, 18, 19, 20 oder 21,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß es in oligomerisierter Form vorliegt.
30

23. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 8, 9, 18, 19, 20, 21 oder 22, der gegen eine für die Erkennung des Peptidliganden verantwortliche Region gerichtet ist.
35

24. Antikörper nach Anspruch 23,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß er gegen eine CDR3-Region gerichtet ist.

25. T-Zelle,

5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie einen T-Zellrezeptor nach Anspruch 20 enthält.

26. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponenten
10 te eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4
oder 10 bis 14, ein Polypeptid nach einem der Ansprüche
8, 9 oder 18 bis 23, einen Peptidliganden gegen das Polypeptid,
einen Antikörper nach Anspruch 23 oder 24 oder
eine Zelle nach Anspruch 6, 7, 16, 17 oder 25 gegebenenfalls
15 zusammen mit anderen aktiven Komponenten, sowie
pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffen
enthält.

27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach
Anspruch 26 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose
20 einer Tumorerkrankung oder einer Prädisposition für
eine Tumorerkrankung.

28. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach
Anspruch 26 zur Herstellung eines Mittels für die Überwachung
25 des Krankheitsverlaufs bei einer Tumorerkrankung.

29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß der Nachweis von T-Zellen, die ein Polypeptid nach
30 Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren, in einer
Probeflüssigkeit durch einen Nucleinsäurehybridisierungsassay,
einen Immunoassay, einen Test auf Bindung spezifischer
Peptidliganden oder einen spezifischen T-Zell-Aktivitätstest
erfolgt.

30. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 26 zur Herstellung eines Mittels für die Prävention oder Therapie einer Tumorerkrankung.

5 31. Verwendung nach Anspruch 30,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Mittel zur Stimulation des Wachstums von T-Zellen, die ein Polypeptid nach Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren, geeignet ist.

10 32. Verwendung nach Anspruch 31,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Mittel zur Wachstumsstimulierung der T-Zellen in vivo geeignet ist.

15 33. Verwendung nach Anspruch 31 oder 32,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Mittel zur Wachstumsstimulierung den Peptidliganden des T-Zellrezeptors oder/und das gesamte Molekül, aus dem der Peptidligand stammt, oder ein Fragment davon
20 umfaßt.

34. Verwendung nach Anspruch 31 oder 32,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
25 daß die Wachstumsstimulierung einen spezifisch den T-Zellrezeptor aktivierenden Antikörper umfaßt.

35. Verwendung nach Anspruch 31,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
30 daß die Wachstumsstimulierung durch Gewinnung spezifischer T-Zellen, in vitro-Expansion und anschließende Verabreichung der expandierten T-Zellen erfolgt.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 27 bis 35,
35 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Tumorerkrankung ein Nierenzellkarzinom ist.

37. Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, die ein Polypeptid nach Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem spezifisch an die CDR3-Region des T-Zellrezeptors bindenden Mittel in Kontakt bringt, die mit dem Mittel reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.
38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel ausgewählt wird aus dem Peptidliganden der T-Zellen, einem den Peptidliganden enthaltenden MHC-Peptidkomplex oder/und einem Anti-TCR-Antikörper.
39. Verfahren nach Anspruch 37 oder 38, weiterhin umfassend eine in vitro-Expansion der T-Zellen.
40. Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, die ein Polypeptid nach Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß man Nucleinsäuresequenzen, die für den T-Zellrezeptor kodieren, in eine T-Zelllinie einführt, und dort zur Expression bringt.
41. Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, die ein Polypeptid nach Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß man Nucleinsäuresequenzen, die für den T-Zellrezeptor kodieren, in die Keimbahn eines Tieres einführt und die T-Zellen aus dem resultierenden, transgenen Tier oder Nachkommen davon gewinnt.
42. Transgenes Tier, dadurch gekennzeichnet, daß die ein Polypeptid nach Anspruch 20 als T-Zellrezeptor exprimieren.

43. Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors nach Anspruch 20, umfassend die Schritte:

(a) Gewinnen von RNA aus Tumorgewebe,

5

(b) Überführen der RNA in doppelsträngige cDNA-Moleküle,

(c) Einbringen der cDNA-Moleküle in Wirtszellen, wobei eine cDNA-Bank erhalten wird,

10

(d) Transfizieren von eukaryontischen Empfängerzellen mit Aliquots der cDNA-Bank, wobei (i) eine Cotransfektion mit HLA-A*0201-DNA erfolgt oder (ii) HLA-A*0201 positive Empfängerzellen verwendet werden,

15

(e) Testen der transfizierten Empfängerzellen auf Fähigkeit zur Sekretion von Cytokinen,

(f) Identifizieren einer cDNA-Sequenz, die für das Antigen, welches den Peptidliganden enthält, kodiert und

20

(g) Identifizieren der Sequenz des Peptidliganden.

44. Verfahren nach Anspruch 43,

25

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß Schritt (e) das Testen auf Fähigkeit zur Lyse von TNF-sensitiven Zellen umfaßt.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleinsäure- und
s Aminosäuresequenzen des humanen T-Zellrezeptors und deren
Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Karzinomen,
insbesondere Nierenzellkarzinomen.

10

/users/vs/anm/13714 17.06.1996

Ergebnisse #26 Tumor i.s.

CDR3 α -Region

Fragment	TCRAV20S1	N-Region	TCRAJ
<u>Klone</u> (14/54)	C L V G TGCCTCGTGGG Va20- oder Ja22-codiert	TG	G S A R Q L T F GTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (1/54)	C L V G TGCCTCGTGGG	A	G S A R Q L T F GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (11/54)	C L V TGCCTCGT	L CCT	S G S A R Q L T F TTCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (5/54)	C L V TGCCTCGTG	L CT	S G S A R Q L T F TTCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (2/54)	C L TGCCTCG	A CTA	T G S A R Q L T F CTGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (1/54)	C L TGCCTCG	V T	S G S A R Q L T F TTCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (1/54)	C L V TGCCTCGTGG	V S TCTCC	G S A R Q L T F GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (1/54)	C L TGCCTCG	D S ACTCC	G S A R Q L T F GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (1/54)	C L TGCCTCG	D AC	S G S A R Q L T F TCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22
<u>Klone</u> (2/54)	C L TGCCTCG	A L A CCCTGGGG	G S A R Q L T F GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT TCRAJ22

Klone (1/54)C L
TGCCTCGA L A
CCCTGGCGG S A R Q L T F
GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klone (1/54)C L
TGCCTCGA P
CGCCCS G S A R Q L T F
TCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klone (2/54)C L
TGCCT

TC

P S G S A R Q L T F
CTTCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22

Ergebnisse #26 Tumor i.s.

CDR3 β -Region

Fragment	TCRBV22S1	N-TCRBD-N	TCRBJ
Klone (8/62)	C A S S TGTGCCAGCAG	E T N CGAAACTAA TCRBD2	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	E T N GAAACTAAT TCRBD2	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	E T S GAAACTTCT TCRBD2	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	E T S GAAACAAG TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A TGTGCCA	T S G T A CCTCCGGGACAGCT TCRBD1	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A R TGTGCCAG	S G T G ATCCGGGACAGG TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G T D GGGACGGA TCRBD1/2	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G T D GGCACAGA TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAG	G T D CGGGACAGAT TCRBD1	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7

Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G T R GGGACTCGT TCRBD2	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G T R GGGACACGT TCRBD1	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G T S S GGA ACTAGCT CTT TCRBD2	Y N E Q F F ACAATGAGCAGTTCTT TCRBJ2S1 (TCRBJ2S7 sehr ähnlich)
<hr/>			
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	G S D GGGTCCGA TCRBD1/2	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
<hr/>			
Klone (5/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	S T G TCGACAGGG TCRBD1	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAG	S T V CTCGACGGT TCRBD1/2	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	S T L TCAACATTA TCRBD2	S Y E Q Y F TCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	S T L F TCAACATTATT TCRBD2	Y E Q Y F CTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klon (1/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	S T A TCGACAGC TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAG	H T D CCACACCGA TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7
Klone (2/62)	C A S S TGTGCCAGCAGT	D T L GACACCCT TCRBD1	S Y E Q Y F CTCCTACGAGCAGTACTT TCRBJ2S7

Ergebnisse :#22 Tumor i.s.

CDR3 α -RegionKlone (13/34)Y C L V G
TACTGCCTCGTGGGTG
Val6- oder JaC-codiertG S A R Q L T F
GTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klone (2/34)Y C L V G
TACTGCCTCGTGGG

G

G S A R Q L T F
GGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klon (1/34)Y C L V G
TACTGCCTCGTGGG

TC

R S A R Q L T F
GTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klone (4/34)Y C L V
TACTGCCTCGTL
CCTS G S A R Q L T F
TTCTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22Klone (2/34)Y C L
TACTGCCTCGA
CTAT G S A R Q L T F
CTGGTTCTGCAAGGCAACTGACCTT
TCRAJ22

Ergebnisse #22 Tumor i.s.

CDR3 β -Region

Klone (10/28)

C A S
TGTGCCAGA D S F K
TGCCGATTCTTTTAA
TCRBD2D T Q Y F
AGATACGCAGTATTT
TCRBJ2S3

Klone (4/28)

C A S S
TGTGCCAGCAGE T N
CGAAACTAA
TCRBD2S Y E Q Y F
CTCCTACGAGCAGTACTT
Jb2.7

Klone (1/28)

C A S S
TGTGCCAGCAGTD Q G M
GATCAGGGGATG
TCRBD2N E Q F F
AATGAGCAGTTCTT
TCRBJ2S1

Klone (1/28)

C A S R
TGTGCCAGCAGW D S E
GTGGGACTCCGAGG
TCRBD2D E Q Y F
ACGAGCAGTACTT
TCRBJ2S7

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-132
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nierenkarzinom-spezifische T-Zellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1341 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..801

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE:1..54

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:55..801

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	AGG	CAA	GTG	GCG	AGA	GTG	ATC	GTG	TTC	CTG	ACC	CTG	AGT	ACT	TTG	48
Met	Arg	Gln	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	
-18			-15				-10						-5			
AGC	CTT	GCT	AAG	ACC	ACC	CAG	CCC	ATC	TCC	ATG	GAC	TCA	TAT	GAA	GGA	96
Ser	Leu	Ala	Lys	Thr	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Met	Asp	Ser	Tyr	Glu	Gly	
	1					5					10					
CAA	GAA	GTG	AAC	ATA	ACC	TGT	AGC	CAC	AAC	AAC	ATT	GCT	ACA	AAT	GAT	144
Gln	Glu	Val	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	His	Asn	Asn	Ile	Ala	Thr	Asn	Asp	
15					20				25						30	
TAT	ATC	ACG	TGG	TAC	CAA	CAG	TTT	CCC	AGC	CAA	GGA	CCA	CGA	TTT	ATT	192
Tyr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Pro	Arg	Phe	Ile	
			35						40						45	

ATT CAA GGA TAC AAG ACA AAA GTT ACA AAC GAA GTG GCC TCC CTG TTT Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe 50 55 60	240
ATC CCT GCC GAC AGA AAG TCC AGC ACT CTG AGC CTG CCC CGG GTT TCC Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser 65 70 75	288
CTG AGC GAC ACT GCT GTG TAC TAC TGC CTC GTG GGT GGT TCT GCA AGG Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Cys Leu Val Gly Gly Ser Ala Arg 80 85 90	336
CAA CTG ACC TTT GGA TCT GGG ACA CAA TTG ACT GTT TTA CCT GAT ATC Gln Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Pro Asp Ile 95 100 105 110	384
CAG AAC CCT GAC CCT GCC GTG TAC CAG CTG AGA GAC TCT AAA TCC AGT Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser 115 120 125	432
GAC AAG TCT GTC TGC CTA TTC ACC GAT TTT GAT TCT CAA ACA AAT GTG Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val 130 135 140	480
TCA CAA AGT AAG GAT TCT GAT GTG TAT ATC ACA GAC AAA ACT GTG CTA Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu 145 150 155	528
GAC ATG AGG TCT ATG GAC TTC AAG AGC AAC AGT GCT GTG GCC TGG AGC Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser 160 165 170	576
AAC AAA TCT GAC TTT GCA TGT GCA AAC GCC TTC AAC AAC AGC ATT ATT Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile 175 180 185 190	624
CCA GAA GAC ACC TTC TTC CCC AGC CCA GAA AGT TCC TGT GAT GTC AAG Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys 195 200 205	672
CTG GTC GAG AAA AGC TTT GAA ACA GAT ACG AAC CTA AAC TTT CAA AAC Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn 210 215 220	720
CTG TCA GTG ATT GGG TTC CGA ATC CTC CTC CTG AAA GTG GCC GGG TTT Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe 225 230 235	768
AAT CTG CTC ATG ACG CTG CGG CTG TGG TCC AGC TGAGATCTGC AAGATTGTAA Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser 240 245	821
GACAGCCTGT GCTCCCTCGC TCCTTCCTCT GCATTGCCCC TCTTCTCCCT CTCCAAACAG	881
AGGGAActCTT CCTACCCCCA AGGAGGTGAA AGCTGCTACC ACCTCTGTGC CCCCCGGCA	941
ATGCCACCAA CTGGATCCTA CCCGAATTTA TGATTAAGAT TGCTGAAGAG CTGCCAAACA	1001
CTGCTGCCAC CCCCTCTGTT CCCTTATTGC TGCTTGTCAC TGCCTGACAT TCACGGCAGA	1061
GGCAAGGCTG CTGCAGCCTC CCCTGGCTGT GCACATTCCC TCCTGCTCCC CAGAGACTGC	1121
CTCCGCCATC CCACAGATGA TGGATCTTCA GTGGGTTCTC TTGGGCTCTA GGTCCCTGGAG	1181

AATGTTGTGA	GGGGTTTATT	TTTTTTTAAT	AGTGTTTCATA	AAGAAATACA	TAGTATTCTT	1241
CTTCTCAAGA	CGTGGGGGGA	AATTATCTCA	TTATCGAGGC	CCTGCTATGC	TGTGTGTCTG	1301
GGCGTGTTGT	ATGTCCTGCT	GCCGATGCCT	TCATTAAAAT			1341

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 267 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Arg	Gln	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu
-18			-15					-10					-5		
Ser	Leu	Ala	Lys	Thr	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Met	Asp	Ser	Tyr	Glu	Gly
		1				5					10				
Gln	Glu	Val	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	His	Asn	Asn	Ile	Ala	Thr	Asn	Asp
15					20					25					30
Tyr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Pro	Arg	Phe	Ile
				35					40					45	
Ile	Gln	Gly	Tyr	Lys	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Glu	Val	Ala	Ser	Leu	Phe
			50					55					60		
Ile	Pro	Ala	Asp	Arg	Lys	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Pro	Arg	Val	Ser
		65					70					75			
Leu	Ser	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Ala	Arg
	80					85					90				
Gln	Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Asp	Ile
95					100					105					110
Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser
				115					120					125	
Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val
			130					135					140		
Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Leu
		145					150					155			
Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser
	160					165					170				
Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile
175					180					185					190
Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys
				195					200					205	
Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn
			210					215					220		
Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe
		225					230					235			

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
240 245

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 936 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..933

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE:1..63

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:64..933

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATG GAT ACC TGG CTC GTA TGC TGG GCA ATT TTT AGT CTC TTG AAA GCA Met Asp Thr Trp Leu Val Cys Trp Ala Ile Phe Ser Leu Leu Lys Ala -21 -20 -15 -10	48
GGA CTC ACA GAA CCT GAA GTC ACC CAG ACT CCC AGC CAT CAG GTC ACA Gly Leu Thr Glu Pro Glu Val Thr Gln Thr Pro Ser His Gln Val Thr -5 1 5 10	96
CAG ATG GGA CAG GAA GTG ATC TTG CGC TGT GTC CCC ATC TCT AAT CAC Gln Met Gly Gln Glu Val Ile Leu Arg Cys Val Pro Ile Ser Asn His 15 20 25	144
TTA TAC TTC TAT TGG TAC AGA CAA ATC TTG GGG CAG AAA GTC GAG TTT Leu Tyr Phe Tyr Trp Tyr Arg Gln Ile Leu Gly Gln Lys Val Glu Phe 30 35 40	192
CTG GTT TCC TTT TAT AAT AAT GAA ATC TCA GAG AAG TCT GAA ATA TTC Leu Val Ser Phe Tyr Asn Asn Glu Ile Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe 45 50 55	240
GAT GAT CAA TTC TCA GTT GAA AGG CCT GAT GGA TCA AAT TTC ACT CTG Asp Asp Gln Phe Ser Val Glu Arg Pro Asp Gly Ser Asn Phe Thr Leu 60 65 70 75	288
AAG ATC CGG TCC ACA AAG CTG GAG GAC TCA GCC ATG TAC TTC TGT GCC Lys Ile Arg Ser Thr Lys Leu Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala 80 85 90	336
AGC AGC GAA ACT AAC TCC TAC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG Ser Ser Glu Thr Asn Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg 95 100 105	384
CTC ACG GTC ACA GAG GAC CTG AAA AAC GTG TTC CCA CCC GAG GTC GCT Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala 110 115 120	432

GTG TTT GAG CCA TCA GAA GCA GAG ATC TCC CAC ACC CAA AAG GCC ACA Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr 125 130 135	480
CTG GTG TGC CTG GCC ACA GGC TTC TAC CCC GAC CAC GTG GAG CTG AGC Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser 140 145 150 155	528
TGG TGG GTG AAT GGG AAG GAG GTG CAC AGT GGG GTC AGC ACA GAC CCG Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro 160 165 170	576
CAG CCC CTC AAG GAG CAG CCC GCC CTC AAT GAC TCC AGA TAC TGC CTG Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu 175 180 185	624
AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCG GCC ACC TTC TGG CAG AAC CCC CGC AAC Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn 190 195 200	672
CAC TTC CGC TGT CAA GTC CAG TTC TAC GGG CTC TCG GAG AAT GAC GAG His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu 205 210 215	720
TGG ACC CAG GAT AGG GCC AAA CCT GTC ACC CAG ATC GTC AGC GCC GAG Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu 220 225 230 235	768
GCC TGG GGT AGA GCA GAC TGT GGC TTC ACC TCC GAG TCT TAC CAG CAA Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln 240 245 250	816
GGG GTC CTG TCT GCC ACC ATC CTC TAT GAG ATC TTG CTA GGG AAG GCC Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala 255 260 265	864
ACC TTG TAT GCC GTG CTG GTC AGT GCC CTC GTG CTG ATG GCC ATG GTC Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val 270 275 280	912
AAG AGA AAG GAT TCC AGA GGC TAG Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly 285 290	936

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Asp Thr Trp Leu Val Cys Trp Ala Ile Phe Ser Leu Leu Lys Ala
-21 -20 -15 -10

Gly Leu Thr Glu Pro Glu Val Thr Gln Thr Pro Ser His Gln Val Thr
-5 1 5 10

Gln Met Gly Gln Glu Val Ile Leu Arg Cys Val Pro Ile Ser Asn His
15 20 25

Leu Tyr Phe Tyr Trp Tyr Arg Gln Ile Leu Gly Gln Lys Val Glu Phe
 30 35 40
 Leu Val Ser Phe Tyr Asn Asn Glu Ile Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe
 45 50 55
 Asp Asp Gln Phe Ser Val Glu Arg Pro Asp Gly Ser Asn Phe Thr Leu
 60 65 70 75
 Lys Ile Arg Ser Thr Lys Leu Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala
 80 85 90
 Ser Ser Glu Thr Asn Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 95 100 105
 Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 110 115 120
 Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 125 130 135
 Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 140 145 150 155
 Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 160 165 170
 Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
 175 180 185
 Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
 190 195 200
 His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 205 210 215
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 220 225 230 235
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
 240 245 250
 Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
 255 260 265
 Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
 270 275 280
 Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 285 290

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGC CTC GTC CTT TCT GGT TCT GCA AGG CAA CTG ACC TTT
Cys Leu Val Leu Ser Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe
295 300

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Cys Leu Val Leu Ser Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..36

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TGC CTC GCT ACT GGT TCT GCA AGG CAA CTG ACC TTT
Cys Leu Ala Thr Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe
15 20 25

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Cys Leu Ala Thr Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TGT GCC AGC AGT GGA ACA GAT TCC TAC GAG CAG TAC TTC
Cys Ala Ser Ser Gly Thr Asp Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
15 20 25

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Cys Ala Ser Ser Gly Thr Asp Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TGT GCC AGC AGT GAA ACA GAT TCC TAC GAG CAG TAC TTC
Cys Ala Ser Ser Glu Thr Asp Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
15 20 25

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Cys Ala Ser Ser Glu Thr Asp Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TGT	GCC	AGC	AGT	GGA	ACA	GCT	TCC	TAC	GAG	CAG	TAC	TTC
Cys	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
	15				20						25	

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Cys	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
1				5					10			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TGT	GCC	AGC	AGT	GGT	ACA	AAC	TCC	TAC	GAG	CAG	TAC	TTT
Cys	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Asn	Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
	15				20						25	

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Cys Ala Ser Ser Gly Thr Asn Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: beides
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LÄNGE: 1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TGCC ACC TCC GGG ACA GCT TCC TAC GAG CAG TAC TTC
 Cys Ala Thr Ser Gly Thr Ala Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
 15 20 25

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Cys Ala Thr Ser Gly Thr Ala Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: beides
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LÄNGE: 1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

TGT GCC AGA TCC GGG ACA GGC TCC TAC GAG CAG TAC TTC
 Cys Ala Arg Ser Gly Thr Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
 15 20 25

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(B) ART: Aminosäure

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Cys Ala Arg Ser Gly Thr Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CACTGAAGAT CCATCATCTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TAGGATGG TGGCAGACAG



P.B. 5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo.nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr.
Weickmann & Weickmann
Patentanwälte
Kopernikusstrasse 9
81679 München
ALLEMAGNE

Weickmann & Weickmann

E 4. DEZ. 2001
Frist:
Patentanwälte 46.1

WV

Datum/Date

27. 11. 01

Zeichen/Ref./Réf.

13714 P EP

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°
97110231.4

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire
Roche Diagnostics GmbH

MITTEILUNG

Das europäische Patentamt übermittelt hiermit

- ☒ den europäischen Recherchenbericht
- ☐ die Erklärung nach Regel 45 EPÜ
- ☐ den europäischen Teilrecherchenbericht nach Regel 45 EPÜ
- ☐ den ergänzenden europäischen Recherchenbericht betreffend die internationale Anmeldung nach Artikel 157(2) EPÜ zu der obengenannten europäischen Patentanmeldung. Kopien der im Recherchenbericht aufgeführten Schriften sind beigefügt.

Die folgenden Angaben des Anmelders wurden von der Recherchenabteilung genehmigt:

☒ Zusammenfassung

☒ Bezeichnung

☐ Abbildung

- ☐ Die Zusammenfassung wurde von der Recherchenabteilung abgeändert und der endgültige Wortlaut ist dieser Mitteilung beigefügt.
- ☐ Die folgende Abbildung wird mit der Zusammenfassung veröffentlicht, weil sie nach Auffassung der Recherchenabteilung die Erfindung besser kennzeichnet als die vom Anmelder angegebene.

Abbildung:

- ☒ Zusätzliche Kopie(n) der im europäischen Recherchenbericht aufgeführten Schriften.

RÜCKERSTATTUNG DER RECHERCHENGEBÜHR

Falls Artikel 10 Gebührenordnung in Anwendung kommt, ergeht noch eine gesonderte Mitteilung der Eingangsstelle hinsichtlich der Rückerstattung der Recherchegebühr.



EPO Form 1507 02.93



GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:

☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt B

☐ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.

☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

☒ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:

1, 4-6 (teilweise), 7, 10-25 (teilweise)

☐ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:



**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT
DER ERFINDUNG
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 1, 4-6 (teilweise), 13-25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die alpha-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region gebildet aus der Kombination eines V-alpha20- und eines J-alpha22-Gensegments umfasst, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.

2. Ansprüche: 2-3, 4-6 (teilweise), 13-25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die alpha-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfasst, ausgewählt aus einer für die Aminosäuresequenz YCL(X1....X2)SARQLTF kodierenden Nucleinsäuresequenz, einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80% zur obigen Aminosäuresequenz kodiert, oder einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente der T-Zellrezeptor-Liganden kodiert, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.

3. Ansprüche: 7, 10-25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die beta-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region gebildet aus der Kombination eines V-beta22- Gensegments, eines D-beta1- oder D-beta2- Gensegments und eines J-beta-Gensegments umfasst, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die



Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.

4. Ansprüche: 8- 25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die beta-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfasst, ausgewählt aus einer für die Aminosäuresequenz CA(X1...X2)Y/DWQYF kodierenden Nucleinsäuresequenz, einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80% zur obigen Aminosäuresequenz kodiert, oder einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente der T-Zellrezeptor-Liganden kodiert, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.

5. Ansprüche: 8- 25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die beta-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfasst, ausgewählt aus einer für die Aminosäuresequenz CA(X1...X2)NEQFF kodierenden Nucleinsäuresequenz, einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80% zur obigen Aminosäuresequenz kodiert, oder einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente der T-Zellrezeptor-Liganden kodiert, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten



**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT
DER ERFINDUNG
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.

6. Ansprüche: 8- 25 (teilweise)

Diese Gruppe von Ansprüchen ist auf eine Nukleinsäure, die für die beta-Kette eines humanen T-Zellrezeptors, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfasst, ausgewählt aus einer für die Aminosäuresequenz CA(X1...X2)DTQYF kodierenden Nukleinsäuresequenz, einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80% zur obigen Aminosäuresequenz kodiert, oder einer Nucleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente der T-Zellrezeptor-Liganden kodiert, einen Vektor, der diese Nukleinsäure enthält, eine Zelle, die diesen Vektor enthält, ein Polypeptid, dass von dieser Nukleinsäure kodiert ist, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Pharmazeutische Zusammensetzungen, die die oben genannten Komponenten enthalten, die Verwendungen dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen, ein Verfahren zur Gewinnung von T-Zellen, ein transgenes Tier, und auf ein Verfahren zur Identifizierung von Peptidliganden eines T-Zellrezeptors gerichtet.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 0231

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Y	EP 0 676 468 A (BRAUN MELSUNGEN AG) 11. Oktober 1995 (1995-10-11) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	C12N15/12 C07K14/725 G01N33/68 C12N5/08
Y	WO 95 28481 A (NEW YORK SOCIETY FOR THE RUPTU) 26. Oktober 1995 (1995-10-26) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	A61K31/70 A61K38/17 C07K16/30 C07K19/00 A01K67/027
Y	WO 94 25489 A (MOHAPATRA SHYAM S ;UNIV MANITOBA (CA); SEHON ALEC H (CA)) 10. November 1994 (1994-11-10) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	
Y	WO 95 08572 A (TRUSTEES FOR THE LELAND STANFO) 30. März 1995 (1995-03-30) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	
Y	WO 95 23164 A (GRAUS JOHANNA PAULINA MARIA ;MAADEN JOHAN MARI V D (NL); AKZO NOBE) 31. August 1995 (1995-08-31) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	
Y	CURRIER J R ET AL: "MITOGENS, SUPERANTIGENS, AND NOMINAL ANTIGENS ELICIT DISTINCTIVE PATTERNS OF TCRB CDR3 DIVERSITY" HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, Bd. 48, Nr. 1/2, 1. Juni 1996 (1996-06-01), Seiten 39-51, XP000647838 ISSN: 0198-8859 * das ganze Dokument *	7,10-25	C12N C07K G01N A61K A01K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 9. November 2001	Prüfer Hillenbrand, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

5

EPO FORM 1503 03.82 (P04/C03)



Europäisches.
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 0231

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Y	LIU D ET AL: "INTRAFAMILY FRAGMENT ANALYSIS OF THE T CELL RECEPTOR BETA CHAIN CDR3 REGION" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, Bd. 187, Nr. 1, 16. November 1995 (1995-11-16), Seiten 139-150, XP002028498 ISSN: 0022-1759 * das ganze Dokument *	7,10-25	
P,X	WO 96 30516 A-(US HEALTH) 3. Oktober 1996 (1996-10-03) * das ganze Dokument *	1,4-7, 10-25	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 9. November 2001	Prüfer Hillenbrand, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

5

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 97 11 0231

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

09-11-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0676468	A	11-10-1995	DE	4408999 A1	28-09-1995
			EP	0676468 A2	11-10-1995
WO 9528481	A	26-10-1995	CA	2188182 A1	26-10-1995
			EP	0753060 A1	15-01-1997
			JP	10504181 T	28-04-1998
			WO	9528481 A1	26-10-1995
			US	6303750 B1	16-10-2001
			US	6084087 A	04-07-2000
WO 9425489	A	10-11-1994	AU	6674094 A	21-11-1994
			WO	9425489 A1	10-11-1994
			EP	0697024 A1	21-02-1996
WO 9508572	A	30-03-1995	AU	695801 B2	20-08-1998
			AU	7840694 A	10-04-1995
			CA	2172512 A1	30-03-1995
			EP	0720622 A1	10-07-1996
			JP	9502981 T	25-03-1997
			WO	9508572 A1	30-03-1995
WO 9523164	A	31-08-1995	AU	1812095 A	11-09-1995
			WO	9523164 A1	31-08-1995
WO 9630516	A	03-10-1996	US	5830755 A	03-11-1998
			AU	709122 B2	19-08-1999
			AU	5373696 A	16-10-1996
			CA	2217009 A1	03-10-1996
			EP	0817844 A1	14-01-1998
			JP	11503014 T	23-03-1999
			WO	9630516 A1	03-10-1996

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82